

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 400**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/06** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2011 E 14188989 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2845601**

54 Título: **Composición para su uso para la disolución de trombos**

30 Prioridad:

**01.11.2010 KR 20100107760**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.08.2018**

73 Titular/es:

**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION  
FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY (100.0%)  
1FL., Yonsei University Engineering Research  
Park 262 Sungsan-ro Seodaemun-gu  
Seoul 120-749, KR**

72 Inventor/es:

**HEO, JI HOE;  
KWON, IL;  
KIM, YOUNG DAE y  
HONG, SUNG YU**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 679 400 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición para su uso para la disolución de trombos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición para su uso en la trombólisis *in vivo*.

Descripción de la técnica relacionada

10 La mayoría de las apoplejías es causada por oclusión tromboembólica de arterias intracerebrales mayores o menores (Wardlaw, Murray *et al.* 2009). En la apoplejía isquémica, la trombólisis rápida es la única opción terapéutica establecida para prevenir el desarrollo de infarto completo ineludible (1995; Choi, Bateman *et al.* 2006). El tratamiento por administración intravenosa del activador tisular plasminógeno recombinante (AtP-r) es la primera y actualmente la única terapia aprobada para la apoplejía isquémica dentro de las 3 horas de la aparición de los síntomas (Caplan, Mohr *et al.* 1997; Lopez-Yunez, Bruno *et al.* 2001). Sin embargo, más de la mitad de los pacientes no logran una recanalización exitosa después del tratamiento trombolítico (Rha y Saver 2007) [Lee *et al. Stroke* 2007; 38: 192-193]. Incluso si una arteria ocluida se recanaliza con éxito mediante el tratamiento trombolítico, sus beneficios se deducen por los riesgos de lesión por reperfusión (Hallenbeck y Dutka 1990), hemorragia intracerebral (Adams, Adams *et al.* 2005) y reclusión (Heo, Lee *et al.* 2003). También se sugirió que AtP-r tiene neurotoxicidad (Chen y Strickland 1997; Wang, Tsirka *et al.* 1998; Nicole, Docagne *et al.* 2001; Yepes, Sandkvist *et al.* 2002; Matys y Strickland 2003).

25 Puesto que la estrategia de recanalización ha demostrado eficacia, aunque tiene una potencia limitada y posibles efectos adversos, se han realizado esfuerzos para desarrollar nuevos agentes trombolíticos con mejores efectos que AtP-r. Incluyen variantes de AtP, activadores del plasminógeno de origen animal y microplasma. Estos fármacos apuntan a lo siguiente: (a) potenciar la especificidad de la fibrina; (2) prolongar la semivida del plasma; (3) estar menos inhibidos por el inhibidor del activador del plasminógeno-1; y (d) evitar la neurotoxicidad. Varios fármacos completaron los ensayos clínicos y en algunos se están estudiando su eficacia. Estos fármacos se dirigen a la fibrina del trombo. Sin embargo, el trombo está formado por la interacción plaqueta-fibrinógeno. La trombina, los leucocitos y los glóbulos rojos también son componentes del trombo. La resistencia de los trombos a los agentes trombolíticos dirigidos a la fibrina es una de las principales razones de las bajas tasas de recanalización en pacientes con apoplejía, que puede ser más común en la oclusión por trombos ricos en plaquetas. A este respecto, el tratamiento dirigido a las plaquetas puede ser una alternativa o aditivo al tratamiento dirigido a las fibrinas para mejorar la eficacia trombolítica.

40 La glicoproteína plaquetaria (GP) IIb/IIIa, un miembro de la familia de las integrinas, existe en la superficie de la membrana plaquetaria con alta densidad (Shattil y Ginsberg 1997). El receptor GPIIb/IIIa media la vía común final de la agregación plaquetaria por unión específica al fibrinógeno (Phillips, Charo *et al.* 1988). Por lo tanto, dirigirse al receptor plaquetario GPIIb/IIIa ha sido el pilar para el desarrollo de fármacos que actúan contra las plaquetas. Se han desarrollado varios antagonistas plaquetarios GPIIb/IIIa, que incluyen el fragmento Fab de un anticuerpo quimérico humano-ratón contra GP IIb/IIIa (abciximab), análogos no peptídicos de un péptido RGD (tirofiban y lamifiban) y un heptapéptido cíclico desintegrina que contiene el motivo KGD (eptifibatide) (Seitz, Meisel *et al.* 2004; Abou-Chebl, Bajzer *et al.* 2005; Eckert, Koch *et al.* 2005). Estos antagonistas GPIIb/IIIa han sido eficaces en pacientes con angina inestable, infarto agudo de miocardio, angioplastia coronaria transfemoral percutánea y prótesis endovascular. En la apoplejía, abciximab no demostró eficacia en pacientes que fueron tratados 5 a 6 horas después de la aparición de los síntomas (Adams, Efron *et al.* 2008). Sin embargo, los antagonistas GPIIb/IIIa resuelven los trombos en pacientes con apoplejía con reclusión y son eficaces en pacientes seleccionados (Heo, Lee *et al.* 2003; Seitz, Hamzavi *et al.* 2003; Seitz, Meisel *et al.* 2004; Eckert, Koch *et al.* 2005; Chen, Mo *et al.* 2007). Además, los inhibidores GPIIb/IIIa son beneficiosos para preservar la permeabilidad microvascular en la apoplejía de un animal y pueden tener un efecto neuroprotector (Choudhri, Hoh *et al.* 1998; Abumiya, Fitridge *et al.* 2000).

55 La saxatilina, una nueva desintegrina purificada y clonada a partir del veneno de serpiente coreana (*Gloydius saxatilis*) tiene la secuencia tripeptídica Arg-Gly-Asp (RGD), que es un sitio de reconocimiento de desintegrinas para un receptor plaquetario GPIIb/IIIa (Hong, Koh *et al.* 2002; Hong, Sohn *et al.* 2002). La saxatilina tiene fuertes efectos inhibidores sobre la agregación plaquetaria (Hong, Koh *et al.* 2002) y la activación plaquetaria (Jang, Jeon *et al.* 2007) de manera que la formación del trombo se interrumpe.

El documento US2005/032189A1 desvela saxatilina, una proteína derivada del veneno de la serpiente coreana *Agkistrodon saxatilis emelianov*, y aplicaciones farmacéuticas de la misma.

60 Descripción detallada de la presente invención

Fines técnicos de la presente invención

65 Los presentes inventores han realizado investigaciones intensivas para desarrollar un agente trombolítico para tratar enfermedades vasculares estenóticas u oclusivas disolviendo trombos preformados. Como resultado, han

descubierto que un péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp tiene una excelente actividad trombolítica para el trombo preformado en el vaso sanguíneo.

5 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para su uso en trombólisis *in vivo*.

Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

10 Soluciones técnicas de la presente invención

En la presente divulgación, se proporciona una composición para su uso en trombólisis *in vivo*, que comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La secuencia tripeptídica Arg-Gly-Asp (RGD) es el sitio de reconocimiento de desintegrinas (Hong, Koh *et al*, 2002; Hong Sohn *et al*, 2002). La desintegrina es un ejemplo representativo que incluye un péptido que incluye el motivo Arg-Gly-Asp. Ya se sabía que la desintegrina inhibe la agregación plaquetaria para interrumpir la formación de trombos. Sin embargo, no se conoce si la desintegrina tiene actividad trombolítica en el trombo preformado *in vivo*.  
 20 Los presentes inventores han descubierto que un péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp tiene una excelente actividad trombolítica para el trombo preformado en el vaso sanguíneo.

25 El término "un péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp" usado en la presente memoria abarca una molécula a base de aminoácidos que disuelve el trombo uniéndose a la integrina presente en el trombo. Se puede usar siempre que la molécula a base de aminoácidos incluya el motivo Arg-Gly-Asp como sitio de reconocimiento de desintegrinas, pero no se limita a la longitud, modificación y propiedad eléctrica del péptido.

30 El péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp usado como principio activo de la presente composición para la trombólisis se une a la integrina presente en el trombo para disolver el trombo por principio de unión por competición, preferentemente GP (glicoproteína) IIb/IIIa presente en la superficie de las plaquetas que forman un trombo. El péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp según la presente invención es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre un grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID NOs: 3-12. El péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp puede ser desintegrina. Por ejemplo, la desintegrina incluye, entre otros, saxatilina, rhodostomina, albolabrina, aplaina, basilicina, batroxostatina, bitistatina, barbourina, cereberina, cerastina, crotatroxina, durisina, equistatina, elegantina, eristicofina, flavoridina, flavostatina, halisina, jararacina, jarastatina, jararina, laquesina, lutosina, molosina, salmosina, tergemina, trigramina, trimestatina, trimucrina, trimutasa, usuristatina y viridina. El péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp es saxatilina, preferentemente la saxatilina comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 12.

40 En una realización, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Además de esto, el péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp que tiene actividad trombolítica puede ser un oligonucleótido (GRGDSP) representado por la SEQ ID NO: 1 y su GRGDSP cíclico, y el oligonucleótido representado por la secuencia de aminoácidos seleccionada entre un grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID NOs: 2-11, pero no se limita a las mismas.

45 El péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp como principio activo para la trombólisis de la presente composición se puede usar con agentes trombolíticos conocidos en la técnica, tales como el activador del plasminógeno. Además, sin agentes trombolíticos conocidos en la técnica, se puede usar solo para disolver de manera eficaz el trombo, que ya se ha generado, y no se produce reoclusión o efectos secundarios, tales como hemorragia.

50 Aunque no de acuerdo con la presente invención, en un ejemplo, la presente composición para trombólisis no comprende activador del plasminógeno. La composición para su uso en trombólisis *in vivo* puede consistir en el péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp.

La presente composición para su uso en trombólisis *in vivo* puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 El vehículo farmacéuticamente aceptable incluido en la composición de la presente invención incluye, como se usa generalmente en el momento de la preparación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma de acacia, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpiroderona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, ácido esteárico, magnesio y aceite mineral, pero la presente invención no se limita a los mismos.

65

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, una emulsión, una suspensión, conservantes y similares. El vehículo o formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuadas se describen en detalle en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica tiene una característica importante que puede ser un trombo disuelto de manera eficaz, que ya se ha generado y agregado, para tratar diversas enfermedades vasculares estenóticas u oclusivas, es decir, la composición farmacéutica no solo previene la generación de trombos para tratar enfermedades vasculares estenóticas u oclusivas, sino que también disuelve trombos que ya se han generado para tratarlos.

El término "oclusión" usado en la presente memoria abarca estados en los que el vaso sanguíneo está completamente bloqueado o estrechado por medio de un bloqueo parcial. El nivel de oclusión se puede determinar sobre la base del flujo sanguíneo medido, es decir, el nivel de oclusión se clasifica como oclusión parcial u oclusión completa. La oclusión parcial significa que el flujo sanguíneo se reduce hasta el nivel del 50-60 % del flujo sanguíneo normal (valor basal del flujo sanguíneo) y oclusión completa significa que el flujo sanguíneo se reduce hasta un nivel del 90-100 % del mismo (véase: Fig. 2).

La composición farmacéutica puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable se describe como anteriormente.

La composición farmacéutica puede administrarse por inyección intravenosa, inyección intraarterial, inyección local, inyección intraventricular, inyección intratecal, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal e inyección transdérmica, preferentemente de manera que se inyecte directamente en el vaso sanguíneo. La manera que se inyecta directamente en el vaso sanguíneo significa la inyección en el vaso sanguíneo incluyendo arterias, venas y capilares, por ejemplo, aorta, carótida, arteria subclavia, arteria celíaca, arterias mesentéricas, arterias renales, arterias ilíacas, arteriolas, capilares, venillas. El método de administración puede seleccionarse apropiadamente según la porción de vaso sanguíneo en la que se genera el trombo.

Una dosificación apropiada de la composición farmacéutica se puede prescribir de diversas maneras según factores, tales como un método de formulación, un método de administración, la edad de un paciente, el peso corporal de un paciente, el sexo de un paciente, la patosis de un paciente, alimentos, un periodo de administración, una vía de administración, una tasa de excreción y sensibilidad a la reacción. El médico experto puede decidir normalmente con facilidad y prescribir la dosis eficaz para el tratamiento deseado. Una dosificación incluida en la composición farmacéutica está dentro de un intervalo de 0,001 a 100 mg/kg, preferentemente de 0,001 a 1.000 mg/kg basado en un adulto.

La composición farmacéutica se puede preparar en un tipo de capacidad unitaria o poniéndose en un recipiente de alta capacidad mediante la preparación con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable según el método que puede realizar fácilmente un experto en la materia en relación con la presente invención. En este momento, la forma de dosificación puede ser un tipo de solución, suspensión, jarabes o emulsión en un medio oleoso o acuoso, o puede ser un tipo de extractos, disolventes, polvos, granulados, comprimidos o cápsulas. Además, puede incluir además un dispersante o un estabilizador.

El péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp como principio activo para la trombólisis de la composición farmacéutica se puede usar con agentes trombolíticos conocidos en la técnica, tales como el activador del plasminógeno. Además, sin agentes trombolíticos conocidos en la técnica, se puede usar solo para disolver eficazmente el trombo, que ya se ha generado, y no se produce reoclusión o efectos secundarios tales como hemorragia.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, en un ejemplo, la composición farmacéutica para trombólisis no comprende activador del plasminógeno.

Aunque no de acuerdo con la presente invención, en un ejemplo, el principio activo trombolítico de la presente composición farmacéutica para trombólisis consiste en el péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp.

Las enfermedades que pueden tratarse mediante la composición farmacéutica incluyen una variedad de enfermedades vasculares estenóticas u oclusivas, por ejemplo, enfermedad cerebrovascular (ECV), enfermedad cardiovascular, enfermedad arteriovascular, enfermedad arterial coronaria (EAC), enfermedad arterial periférica (EAP), preferentemente apoplejía, infarto cerebral, trombosis cerebral, embolia cerebral, infarto acunar, síndrome coronario agudo, angina de pecho, coartación de la aorta, infarto de miocardio, migraña, bloqueo de rama, isquemia cerebral, evento arteriovascular isquémico agudo, tromboflebitis, tromboembolismo venoso, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, enfermedad vascular periférica, cefalea vascular, aterosclerosis, espasmo vascular, reestenosis, reestenosis después de angioplastia de globo y oclusión del vaso por vasculitis, y más preferentemente apoplejía, infarto cerebral, trombosis cerebral, embolia cerebral, infarto de miocardio.

La expresión "enfermedad cerebrovascular (ECV)" usada en la presente memoria se refiere a la enfermedad de vasos arterioescleróticos que se produce en los vasos sanguíneos que suministran la sangre rica en oxígeno a la cara y al cerebro. En general, incluye la enfermedad isquémica así como enfermedad comórbida EAC y/o EAP (enfermedad arterial periférica). Por ejemplo, la ECV incluye enfermedad cerebrovascular isquémica, apoplejía isquémica aguda, apoplejía isquémica, apoplejía hemorrágica, venas varicosas, deterioro cognitivo leve (DCL) o ataques isquémicos transitorios (AIT), pero no se limita a estos.

La expresión "enfermedad cardiovascular" o "enfermedad vascular arterioesclerótica" usada en la presente memoria es una expresión general usada para clasificar numerosos estados que afectan al corazón, a las válvulas cardíacas, a la sangre y a la vasculatura. Incluye enfermedades que afectan al corazón o a los vasos sanguíneos, preferentemente el síndrome metabólico, síndrome X, aterosclerosis, trombosis, enfermedad arterial coronaria, angina inestable y estable, apoplejía, estenosis aórtica o aneurisma aórtica, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica o eventos ateroscleróticos isquémicos agudos, pero no se limita a estos. En general, la expresión "enfermedad vascular arterioesclerótica" usada en la presente memoria significa enfermedades isquémicas o enfermedades proisquémicas en lugar de enfermedades no isquémicas.

La expresión "enfermedad arterial coronaria (EAC)" usada en la presente memoria significa enfermedad de vasos arterioescleróticos en la que la arteria (arteria coronaria) que suministra sangre al músculo cardíaco se endurece y/o estrecha por aterosclerosis o se produce precipitación de calcio). EAC da como resultado la reducción del flujo sanguíneo al músculo cardíaco de tal manera que el músculo cardíaco es privado de una cantidad suficiente de oxígeno para causar necrosis. La EAC incluye síndrome arterial coronario agudo, infarto de miocardio (ataque al corazón), angina (estable e inestable), aterosclerosis y aterotrombosis, pero no se limita a estos.

La expresión "enfermedad arterial periférica (EAP)" usada en la presente memoria se refiere a enfermedades de cualquiera de los vasos sanguíneos fuera del corazón y el cerebro. En general, incluye enfermedad comórbida ocurrida con EAC.

La composición farmacéutica tiene una característica importante que puede ser un trombo disuelto de manera eficaz, que ya se ha generado y agregado, para tratar diversas enfermedades vasculares estenóticas u oclusivas.

Por ejemplo, en el caso de un infarto cerebral, ya se conocen adecuadamente composiciones farmacéuticas para prevenir la generación de trombos (p. ej., aspirina). Sin embargo, una vez que el infarto cerebral se produce por la generación de trombos y la oclusión de los vasos sanguíneos del cerebro, no hay composiciones farmacéuticas que puedan tratarlo eficazmente.

El tratamiento por administración intravenosa del activador tisular de plasminógeno recombinante (AtP-r) es actualmente la única terapia aprobada para el infarto cerebral dentro de las 3 horas de la aparición de los síntomas. Sin embargo, más de la mitad de los pacientes no logran una recanalización exitosa después del tratamiento trombolítico. En tales circunstancias, la presente composición farmacéutica, que puede disolver eficazmente el trombo preformado, es un enfoque realista e innovador en el tratamiento de enfermedades vasculares estenóticas u oclusivas que ya se han producido. Además, la presente composición farmacéutica para tratar enfermedades vasculares estenóticas u oclusivas posee un gran valor en términos de que trata eficazmente la oclusión de microvasos y tampoco produce reestenosis.

En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene actividad trombolítica, que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre un grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID NOs: 3 y 5.

Los presentes péptidos son derivados de saxatilina (es decir, mutantes de delección) basados en la secuencia de aminoácidos de saxatilina (SEQ ID NO: 12), que se preparan con secuencias optimizadas de aminoácidos prediciendo secuencias que exhiben actividad de saxatilina más eficaz, es decir, capacidad de trombólisis respecto al trombo preformado.

Los presentes derivados de saxatilina tienen una excelente propiedad farmacéutica al igual que la saxatilina de longitud completa.

En primer lugar, la presente longitud de derivados de saxatilina es más corta que la saxatilina de tipo salvaje de longitud completa. Sin embargo, su capacidad para la trombólisis es similar (véanse las Figs. 7 y 8).

En segundo lugar, dado que la inmunogenicidad de los presentes derivados de saxatilina se reduce para inducir una respuesta inmunitaria en menor medida que la saxatilina de tipo salvaje de longitud completa, tiene una seguridad excelente en comparación con la saxatilina de tipo salvaje de longitud completa.

En tercer lugar, los presentes derivados de saxatilina muestran la tendencia a que la frecuencia de reoclusión post-recanalización y la fluctuación del flujo sanguíneo se redujo significativamente en el tratamiento trombolítico por derivados de saxatilina (SX1) en comparación con la saxatilina de tipo salvaje, abordando que el flujo sanguíneo

normal se mantuvo estable (véanse las Figs. 7 y 8). Tal patrón trombolítico de derivados de saxatilina da como resultado un aumento de la eficacia terapéutica y una reducción de los efectos secundarios en comparación con la saxatilina de tipo salvaje.

- 5 El término "péptido" usado en la presente memoria se refiere a una molécula lineal formada uniendo residuos de aminoácidos a través de enlaces peptídicos.

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar mediante procesos convencionales de síntesis química conocidos por los expertos en la materia, en particular, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54 (1963); Stewart, *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)).

15 Aunque el péptido de la presente invención tiene *per se* mayor estabilidad que la saxatilina de origen natural, las modificaciones de aminoácidos permiten una estabilidad mucho mayor. Aunque no de acuerdo con la presente invención, en una realización, el extremo C-terminal del péptido puede modificarse en -OH o -NH<sub>2</sub>, el extremo N-terminal del péptido puede combinarse con un grupo de protección seleccionado entre el grupo que consiste en grupo acetilo, grupo fluorenilmetoxicarbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo, polietilenglicol (PEG) y un aminoácido.

20 Las modificaciones del aminoácido como se han descrito anteriormente también son responsables de la estabilidad de los presentes péptidos. El término "estabilidad" usado en la presente memoria se refiere también a la estabilidad *in vivo* y a la estabilidad durante el almacenamiento (p. ej., estabilidad de almacenamiento a temperatura ambiente). El grupo de protección como se ha descrito anteriormente protege los péptidos del ataque de proteasas *in vivo*. El péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp incluye SX1 (SEQ ID NO: 3), SX2 (SEQ ID NO: 4), SX3 (SEQ ID NO: 5), XL1 (SEQ ID NO: 6), XL2 (SEQ ID NO: 7), XL3 (SEQ ID NO: 11), LS1 (SEQ ID NO: 8), LS2 (SEQ ID NO: 9) y LS3 (SEQ ID NO: 10), más preferentemente SX1, SX2, SX3 y XL2, aún más preferentemente SX1 y SX3, lo más preferentemente SX1.

30 Según la presente divulgación, el método se puede aplicar eficazmente en el tratamiento de vasos sanguíneos por trombos formados. En otras palabras, el péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp de la presente invención puede no solo inhibir la formación de trombos, sino también disolver eficazmente el trombo preformado. Por lo tanto, el método se puede aplicar de forma eficaz a la oclusión vascular (oclusión parcial o completa) ocurrida en el paciente (p. ej., infarto cerebral) disolviendo trombos preformados que se van a tratar.

35 Según la presente divulgación, la concentración de tratamiento del péptido que comprende el motivo Arg-Gly-Asp en la presente invención es 1-100 mg/kg, más preferentemente 5-70 mg/kg, lo más preferentemente 10-40 mg/kg.

40 Según la presente divulgación, el método se puede aplicar a animales. El animal no está particularmente limitado e incluye preferentemente mamíferos, más preferentemente humanos, ratones, ratas, conejos, monos, cerdos, caballos, vacas, ovejas, antílopes, perros o gatos, aún más preferentemente humanos o ratones.

45 Según la presente divulgación, el vaso del animal incluye arterias, venas y capilares, más preferentemente aorta, carótida, arteria subclavia, arteria celíaca, arterias mesentéricas, arterias renales, arterias ilíacas, arteriolas, capilares y venillas, y lo más preferentemente aorta o carótida.

Efectos de la presente invención

Las características y ventajas de la presente invención se resumirán de la siguiente manera:

- 50 (i) La presente invención se refiere a una composición para su uso en trombólisis *in vivo* que comprende:
- (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 3-12, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 (ii) Las composiciones de la presente invención tienen la ventaja de que disuelven eficazmente trombos ya formados adoptando el principio de dirigirse a la integrina dentro del trombo, tal como la superficie plaquetaria GPIIb-IIIa, que no es el mismo que el principio existente de activación del plasminógeno.
- 60 (iii) Asimismo, las composiciones de la presente invención tienen una función protectora del nervio cuando se abren de manera eficaz en la microvasculatura, sin que se produzca reestenosis después de la penetración.

Breve descripción de los dibujos

65 La Fig. 1a representa el resultado del patrón de oclusión según la aplicación de FeCl<sub>3</sub>. Después de la aplicación de FeCl<sub>3</sub>, el flujo sanguíneo se redujo casi a cero. Finalmente, el vaso sanguíneo se ocluye y se mantiene.

La Fig. 1b representa el resultado de la tinción H y E para detectar el trombo. Como resultado de medir el tamaño del trombo generado en 5 animales, se genera el tamaño uniforme del trombo de modo que se consideró como un modelo adecuado para verificar el efecto por el agente trombolítico.

La Fig. 2 representa los resultados de medición del flujo sanguíneo en vasos sanguíneos normales y diversos vasos sanguíneos ocluidos y la detección de trombos generados en los vasos de los mismos.

La Fig. 3 representa el gráfico que mide los cambios en el flujo sanguíneo según la dosis de saxatilina-r. A medida que aumentan las dosis de saxatilina-r, el flujo sanguíneo (el área bajo las curvas de flujo-tiempo) se restableció casi hasta el nivel basal (dosis de saxatilina-r de 5 mg/kg y 10 mg/kg).

La Fig. 4 representa los resultados de comparación del efecto trombolítico de la saxatilina según el método de administración. La flecha azul en el panel A indica el punto temporal de reoclusión observada. B en el panel A indica inyección en bolo. I en el panel A indica infusión intravenosa continua.

La Fig. 5 representa los resultados del efecto trombolítico dependiente de la dosis de saxatilina. Se administraron diversas concentraciones de saxatilina a animales inducidos por  $\text{FeCl}_3$  y se controló de manera continua el flujo sanguíneo durante 2 horas.

La Fig. 6 representa los resultados del nivel inhibitor de la agregación plaquetaria de saxatilina y derivados de saxatilina (SX1 y SX3).

La Fig. 7 representa los resultados de los cambios en el flujo sanguíneo a través de tratamientos de saxatilina y derivados de saxatilina (SX1 y SX3) en 40 mg/kg de dosis.

La Fig. 8 representa los resultados de los cambios en el flujo sanguíneo a través de tratamientos de saxatilina y derivados de saxatilina (SX1 y SX3) en 20 mg/kg de dosis.

## Ejemplos

### Métodos experimentales

Animales experimentales y trombosis de la arteria carótida inducida por  $\text{FeCl}_3$

Se usaron 8 ratones (OrientBio) de dos semanas de edad del IIC (Instituto de Investigación del Cáncer). El cuidado y uso de animales de laboratorio se realizaron según el protocolo aprobado institucionalmente según la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Para los procedimientos operativos, los animales fueron anestesiados con una inhalación de isoflurano al 5 % en una mezcla de 70 % de  $\text{N}_2\text{O}$  y 30 % de  $\text{O}_2$ . La anestesia se mantuvo con 2 % de isoflurano. Durante los procedimientos operativos, la temperatura corporal se controló de forma continua con una sonda rectal y se mantuvo a  $37,0 \pm 0,2$  °C por medio de una unidad de control de manta homeotérmica y almohada eléctrica (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Para ensayar la actividad trombolítica de la saxatilina-r *in vivo*, se usó el modelo de trombo carotídeo inducido por  $\text{FeCl}_3$  (Sigma Aldrich, EE. UU.). Se realizó una incisión cervical en la línea media, y la arteria carótida común izquierda se diseccionó cuidadosamente bajo un microscopio quirúrgico. Se colocó una sonda ultrasónica de flujo Doppler (Transonic MA0.7PSB) alrededor de la porción media de la arteria carótida común (ACC). El flujo sanguíneo carotídeo se obtuvo con un medidor de flujo sanguíneo Transonic TS420 (Transonic Instruments, Ithaca, NY) y el sistema de adquisición de datos iWorx IX-304T (iWorx Systems, Inc., Dover, NH). El flujo de valor basal de control de la ACC se midió durante 5 minutos. Después de la determinación del flujo de valor basal de control, la sonda se retiró. La lesión vascular oxidativa con estrés químico se indujo colocando un papel de filtro (700 x 500  $\mu\text{m}$ ) saturado con 50 % de  $\text{FeCl}_3$  en la superficie adventicia del punto medio de la ACC expuesta durante 5 minutos. Después de retirar el papel de filtro, la ACC se lavó con solución salina normal y se registró su flujo sanguíneo. La formación de trombos y la oclusión arterial se determinaron mediante la disminución del flujo sanguíneo y la oclusión completa se definió como la ausencia de flujo sanguíneo mantenido durante 10 minutos.

Determinación de oclusión trombótica y medición de tamaño

Se evaluó la consistencia del modelo en la formación y el tamaño del trombo. Diez minutos después de la oclusión completa, los segmentos de ACC lesionados se escindieron y se sumergieron en paraformaldehído al 4 % para su fijación, y se embebieron en parafina para su análisis histológico. Los bloques de parafina se seccionaron consecutivamente en una dirección longitudinal con un espesor de 3  $\mu\text{m}$ . Los cortes seccionados se montaron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina (Dako, Dinamarca) y eosina (Sigma Aldrich, EE. UU.). El tamaño del trombo (longitud y área longitudinal) en cada animal se determinó mediante el uso del software Scion Image Analysis (Scion Co., Frederick, MA, EE. UU.) en un corte que mostró el mayor tamaño de trombo.

Saxatilina recombinante usada como agente trombolítico

La saxatilina se usó como agente trombolítico, en los presentes ejemplos se usó saxatilina recombinante (saxatilina-r), que se aisló y purificó según el método descrito en la publicación de patente de la República de Corea n.º 2002-0064787, y su secuencia de aminoácidos se muestra como se expone en SEQ ID NO: 12.

Trombolisis intravenosa por saxatilina recombinante

Diez minutos después de la oclusión de la ACC, se administró saxatilina-r por vía intravenosa a través de la vena femoral izquierda mediante el uso de una bomba de infusión (KD Scientific Inc., EE. UU.) conectada a un tubo PE-10. El flujo sanguíneo carotídeo se controló de forma continua durante 2 horas desde el momento inicial de la inyección.

Respuesta a la dosis de saxatilina-r

Para evaluar la respuesta a la dosis de saxatilina-r, los animales se dividieron aleatoriamente en siete grupos (cinco ratones en cada grupo): solución salina normal (grupo de control), 1, 1,75, 2,5, 3,75, 5,0 y 10,0 mg/kg de grupos de administración de saxatilina-r. El 10 % de la dosis se administró en bolo por vía intravenosa y el resto se infundió de forma continua durante 60 min.

Métodos de administración de saxatilina-r

Los efectos de la saxatilina-r para la trombólisis se evaluaron según el método de administración. Para este experimento, se usó una dosis total de 5 mg/kg de saxatilina-r en cada animal, y los animales se dividieron en cuatro grupos (cinco ratones en cada grupo): (a) inyección en bolo de la dosis total (5 mg/kg); (b) inyección doble en bolo de saxatilina-r con media dosis (2,5 mg/kg) de saxatilina-r a los 10 minutos después de la oclusión y 60 minutos después de la primera inyección en bolo; (c) una inyección en bolo con media dosis (2,5 mg/kg) a los 10 minutos después de la oclusión, y luego infusión continua durante 60 minutos de la dosis restante; y (d) inyección en bolo de 10 % de la dosis total (0,5 mg/kg) a los 10 minutos después de la oclusión, y luego infusión continua de la dosis restante (4,5 mg/kg) durante 60 minutos.

Evaluación de la recanalización

La presencia y el grado de recanalización se evaluaron midiendo el flujo sanguíneo. Los datos de flujo sanguíneo en el valor basal del estudio y los controlados de forma continua durante 2 horas después de la oclusión de ACC se adquirieron mediante el software de adquisición de datos iWorx Labscribe2 (versión 2.045000). Inmediatamente después de 2 horas de monitorización del flujo sanguíneo, se obtuvo la ACC en todos los ratones, se fijó con solución de paraformaldehído al 4 % y se embebió en parafina para el examen histológico. Los bloques de parafina se seccionaron consecutivamente en una dirección transversal con un espesor de 3 µm, se montaron sobre un portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Respuesta a la dosis de saxatilina-r

El flujo sanguíneo carotídeo se analizó por el área bajo las curvas de flujo-tiempo. Todos los valores medidos fueron estandarizados por el flujo sanguíneo mínimo de cada animal para evitar las diferencias causadas por la variación de la condición fisiológica entre los animales. El efecto trombolítico se calculó como se indica a continuación, y se expresó como porcentaje medio del flujo sanguíneo del valor basal del control: (media flujo sanguíneo del tiempo de tratamiento con saxatilina-r/media flujo sanguíneo del valor basal de control) x 100 (%). Los valores medios de cada grupo en el estudio de respuesta a la dosis se calcularon y demostraron mediante una curva de actividad trombolítica estándar (media ± D.T.).

Patrón de tiempo de los efectos trombolíticos

Se calculó el flujo sanguíneo promedio cada minuto en cada animal para mostrar el patrón representativo dependiente del tiempo de la dosis y el método de administración respectivos o saxatilina-r. Se calcularon los valores medios de todos los animales en cada grupo y los cambios temporales se mostraron como gráficos de barras continuas (media ± D.T.).

Tiempo para recanalización

Se evaluó el tiempo desde la administración de saxatilina-r hasta la recanalización eficaz. La recanalización eficaz se definió como la restauración del flujo sanguíneo a al menos el 50 % del nivel de valor basal de control, que se mantuvo durante más de 30 minutos.

Establecimiento del sistema de expresión de derivados de saxatilina derivada del veneno de serpiente

*Clonación de derivados de saxatilina optimizados en secuencia y preparación del vector pPIC9*

El sistema de expresión de *Pichia* y el vector se construyeron y usaron como un sistema de expresión de derivados de saxatilina.

En primer lugar, para preparar proteínas optimizadas para la secuencia peptídica, se emprendió la optimización de codones con frecuencia de uso de codones para la expresión del gen de saxatilina en células huésped de *Pichia*,

convirtiendo así el gen de saxatiliina en la secuencia de nucleótidos optimizada (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 21). La secuencia de nucleótidos optimizada se diseñó para clonarse en un vector pPIC9 (Invitrogen) adecuado para la expresión en células huésped de *Pichia* (GS115, His; EyeGene Inc.). Más específicamente, el sitio de restricción *XhoI* se colocó en la porción 5' del gen de saxatiliina y el sitio de restricción *EcoRI* en su porción 3'. El gen se insertó entre los sitios de restricción *XhoI* y *EcoRI* posicionados en SMC (sitio de multiclonación) del vector pPIC9 como vector para la expresión de la célula huésped de *Pichia* (GS115). El gen de saxatiliina clonado en el vector pPIC9 se preparó para expresar la forma de proteína de fusión con el factor  $\alpha$  de levadura. Cuando el factor  $\alpha$  de levadura se secretaba extracelularmente actuando como una secuencia señal para la secreción extracelular de la proteína, el factor  $\alpha$  de levadura se escindió y se eliminó. Dado que la saxatiliina sintetizada se secretó en un medio, el medio se recogió y se purificó para usarlo como muestra de saxatiliina para un análisis eficaz de la actividad.

Preparación de cepas bacterianas para preservar el vector de expresión de derivados de saxatiliina

Para el aislamiento/purificación y preservación del vector de expresión, se transformó *DH5 $\alpha$*  para preparar cepas de bacterias para la conservación (reserva de glicerol, almacenamiento a -70 °C). Para la transformación de *Pichia pastoris*, se usaron muchos vectores de expresión en el proceso de transformación de la célula huésped de *Pichia* (GS115), en comparación con la transformación de *DH5 $\alpha$* . Para inducir la recombinación específica del sitio como proceso de inserción cromosómica del gen de saxatiliina, el plásmido se linealizó por escisión de porción de gen específico (locus *HIS4*) en el vector de expresión (es decir, en el caso del vector pPIC9, se usó *Sall* o *StuI* para escindir). La célula competente GS115 se mezcló con 10-50  $\mu$ g de plásmido vector de expresión linealizado y 40  $\mu$ g de ADN transportador (ADN de esperma de salmón) para transformar. Luego, se seleccionó una colonia individual bien desarrollada. El ADN del genoma se extrajo y se llevó a PCT para verificar si el gen de la saxatiliina introducido en la célula por transformación se insertó entre su gen *his4* en el cromosoma de *Pichia* (GS115).

Expresión de verificación de derivados de saxatiliina

Se seleccionaron partes de la inserción verificada del gen de la cepa *Pichia* para determinar la expresión de proteínas. La cepa candidata se cultivó y se analizó mediante el método SDS-PAGE.

Expresión y purificación de derivados de saxatiliina

*Preparación de muestra de derivados de saxatiliina para un análisis eficaz de la actividad*

Para preparar la muestra proteica de derivados de saxatiliina, la cepa seleccionada se cultivó masivamente en un matraz. La condición de cultivo fue la misma que la condición de cultivo de la cepa, excepto para aumentar el aporte de metanol y el oxígeno usado en el metabolismo. Brevemente, se usó fermentación, la cepa se llevó a cabo a 30 °C usando un fermentador discontinuo (KF7; KBT Co., Ltd.). El sistema del fermentador era de 7 litros (en realidad 5 litros), el sistema de control era temperatura/rpm/aire/O<sub>2</sub>/pH/DO, y el modo de operación era continuo, discontinuo, semicontinuo. En primer lugar, la cepa se cultivó en medio YNB (1,7 g de base de nitrógeno para levaduras, 5,0 g de sulfato de amonio, 11,5 g de fosfato de potasio (monobásico), 2,85 g de fosfato de potasio (dibásico), glicerol por 1 litro) durante 1 día, el medio resultante fue cultivado con cultivo continuo (pH 5,0; medio de inicio, 54 ml de ácido fosfórico, 1,8 g de sulfato de calcio (anhidro), 36 g de sulfato de potasio, 30 g de sulfato de magnesio (7H<sub>2</sub>O), 8,26 g de hidróxido de potasio, 80 g de glicerol, 8,8 ml de TMS (solución de traza de metal) por 2 litros) durante 1 día. La solución de TMS (almacenamiento a temperatura ambiente) se preparó para que se añadieran secuencialmente 6,0 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 4,28 g de MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 20,0 g de ZnCl<sub>2</sub>, 65,0 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,08 g de NaI, 0,2 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,2 g de ácido bórico, 0,92 g de COCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, y 0,2 g de biotina a una cantidad adecuada de agua destilada para disolver, se ajustó a 1 litro de volumen y se esterilizó mediante un filtro de 0,2  $\mu$ m. El medio continuo se condujo al cultivo discontinuo con glicerol (GFBM, pH 5,0; 0,5 litros de glicerol se mezclaron con 0,5 litros de agua destilada, se esterilizó por estimulación, se enfrió a temperatura ambiente y se añadió a 12 ml de TMS por 1 litro de GFBM para preparar) durante 8-10 horas. El medio se trató con metanol (MeOH) durante 3 horas para inducir proteínas, y luego se condujo al cultivo discontinuo de MeOH (MFBM, pH 5,0; 12 ml de TMS por 99,9 % de MeOH industrial 1 litro se mezcló para prepararlo, fue inmediatamente usado sin ningún tratamiento de esterilización adicional, y se esterilizaron los recipientes y los tubos para su uso) durante 3 días. El cultivo se condujo a semicontinuo con MeOH según sea necesario. En este momento, el caudal de MeOH era 6-15 ml/litro/hora en 1 día y 15-20 ml/litro/hora en 2-3 días usando DO-STAT (DO punto de ajuste, mínimo 6 ppm). Mientras tanto, se proporcionó oxígeno desde el cultivo de GFBM y el suministro de oxígeno puro fue de 0,2-0,4 vvm.

*Protocolos para el aislamiento y la purificación de derivados de saxatiliina*

El aislamiento y la purificación de derivados de saxatiliina (SX1, SX2, SX3, XL1, XL2, XL3, LS1, LS2 y LS3) se llevaron a cabo de la siguiente manera.

En primer lugar, los derivados de saxatiliina transformados por cepas de levadura se cultivaron en alta densidad y luego se recogió el sobrenadante de fermentación. Para la absorción de resina, el sobrenadante se pretrató con sulfato de amonio (A/S) a una concentración 2 M y se llevó a cromatografía de captura. La resina de fenil sefarosa 6 FF se rellenó en 75 ml de columna de fenil sefarosa FF (GE Healthcare) y se cargó el sobrenadante. Según el

protocolo de aumento, el sobrenadante de fermentación se absorbió, se lavó con 5 veces el volumen de columna (5 VC) de solución tampón de equiponderación (A/S 2,0 M en TFS) y 4 veces el volumen de columna (4 VC) de solución tampón de lavado y elución del grupo activo con una concentración de A/S 1,0 M, 0,8 M, 0,7 M y 0,5 M. Como resultado, la solución tampón de elución de 'x0,5 solución tampón TFS + A/S' 0,8 M tiene los mejores resultados de elución en términos de calidad y rendimiento. La regeneración de la columna se realizó con 3 veces el volumen de la columna (3 VC) de NaOH 1 N y 5 veces el volumen de la columna (5 VC) de agua destilada.

En segundo lugar, se llevó a cabo una cromatografía abrasiva usando la solución tampón de elución obtenida. Después del pretratamiento de la misma condición que se ha descrito anteriormente, la resina se rellenó en 215 ml de columna SOURCE30 RPC/FINELINE Pilot35 (GE Healthcare) y la solución de tampón de elución se cargó para absorber. Después de lavar con 5 veces el volumen de la columna (5 VC) de solución tampón de equiponderación (TFA al 0,1 % en DDW) y 5 veces el volumen de la columna (5 VC) de solución tampón de lavado (TFA al 0,1 % en acetonitrilo al 10 % (ACN)), el grupo activo se eluyó con 3 veces el volumen de la columna (3 VC) de solución tampón de elución (TFA al 0,1 % en 30 % de ACN). Posteriormente, la regeneración de la columna se realizó con 3 veces el volumen de columna (3 VC) de NaOH 1 N (en 40 % de ACN).

En tercer lugar, se llevó a cabo la cromatografía Sephadex LH20 (GE Healthcare). El grupo activo obtenido de RPC se intercambió con la solución de tampón de almacenamiento final para aplicar al producto de purificación. Se usó UF CPM de 5KDa para esto. Dado que el peso molecular de la saxatilina es de 7,7 kDa, se esperaba que disminuyera el rendimiento. El resultado final también mostró más del 10 % de disminución. Particularmente, dado que el disolvente orgánico acetonitrilo se incluyó aproximadamente en un 30 % en el grupo activo de RPC, se usó la membrana UF. Mientras tanto, en lugar del método UF, se puede usar filtración en gel. Sephadex LH20 es una resina que puede utilizarse como disolvente orgánico y muy adecuada para la desalinización de saxatilina, obteniéndose así derivados finales de saxatilina.

Los derivados de saxatilina obtenidos se esterilizaron mediante un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y se midió la pureza. A continuación, los derivados de saxatilina de alta pureza se liofilizaron, se envasaron de forma estéril y se almacenaron a -80 °C hasta su administración.

Posteriormente, la trombólisis intravenosa y la respuesta a la dosis mediante derivados de saxatilina se llevaron a cabo con el mismo método de saxatilina recombinante que se ha descrito anteriormente (Figs. 7 y 8).

## Resultados

### La consistencia de un modelo animal

Después de 5 minutos de aplicación de  $\text{FeCl}_3$ , el flujo sanguíneo de la ACC se redujo rápida y consistentemente casi a cero en los 5 animales examinados (Fig. 1a). La oclusión trombótica de la ACC se demostró en los exámenes histológicos (Fig. 1b). Los tamaños del trombo fueron similares entre los animales (longitud:  $1,139 \pm 0,091$  mm, área:  $0,799 \pm 0,139$  mm<sup>2</sup>). En los grupos tratados con saxatilina-r, los exámenes histológicos mostraron que el trombo no se veía en el lumen carotídeo de los ratones con flujo carotídeo completamente restaurado, mientras que el trombo permanecía en el lumen carotídeo de los ratones sin flujo sanguíneo carotídeo restaurado o flujo parcialmente restaurado (Fig. 2).

### Efectos trombolíticos dependientes de la dosis de saxatilina-r

Los efectos dependientes de la dosis de saxatilina-r se determinaron usando datos del área bajo la curva de flujo-tiempo (Fig. 3). El tratamiento con saxatilina-r no produjo ningún cambio notable en una dosis de 1 mg/kg (2,36  $\pm$  0,78 %) o 1,75 mg/kg (4,97  $\pm$  3,94 %), cuando se comparó con el grupo con solución salina normal (2,47  $\pm$  1,07 %). Se observó el restablecimiento del flujo sanguíneo en una dosis de 2,5 mg/kg (32,50  $\pm$  33,70 %) y se aumentó de una manera dependiente de la dosis. El flujo sanguíneo se restauró casi al nivel de valor basal (94,50  $\pm$  20,47 %) a una dosis de 5 mg/kg. No hubo diferencias significativas entre 5 y 10 mg/kg de saxatilina-r.

### Efectos de la saxatilina-r por métodos de administración

El método óptimo de administración de la administración intravenosa de saxatilina-r se determinó mediante el uso de una dosis total de 5 mg/kg, que mostró efectos satisfactorios en el estudio de respuesta a la dosis. Los porcentajes medios del flujo sanguíneo, que se compararon con el flujo sanguíneo de valor basal, fueron los siguientes: (a) 77,01  $\pm$  46,11 % en el grupo con una inyección en bolo de una dosis total; (b) 85,23  $\pm$  29,95 % en el grupo con inyección doble en bolo con media dosis; (c) 80,72  $\pm$  30,13 % en el grupo con una inyección en bolo con media dosis; y (d) infusión continua de la dosis restante, y 94,50  $\pm$  20,47 % en el grupo con una inyección en bolo del 10 % de la dosis total y una infusión continua de la dosis restante.

La disminución de los efectos trombolíticos se observó en diferentes momentos según el método de administración. La reoclusión abrupta se observó en puntos temporales de la siguiente manera: (a) aproximadamente 50 minutos después de la primera inyección en ratones tratados con inyección doble en bolo; (b) aproximadamente 100 minutos

después de una inyección en bolo de la dosis total; y (c) aproximadamente 110 minutos después de una inyección en bolo con la mitad de la dosis y después de la infusión continua de la otra mitad de la dosis (Fig. 4). No se observó reoclusión con la inyección en bolo del 10 % de la dosis total y la infusión continua de la dosis restante.

5 Tiempo de recanalización por saxatilina-r

No se observó una recanalización eficaz en ratones tratados con solución salina normal, saxatilina-r de 1 mg/kg o saxatilina-r de 1,75 mg/kg. Solo dos de los cinco ratones tratados con 2,5 mg/kg y tres de los cinco ratones tratados con 3,75 mg/kg de saxatilina-r lograron una recanalización eficaz.

10 La recanalización eficaz se definió como la restauración del flujo sanguíneo al 50 % del nivel del valor basal y se mantuvo más de 30 min (Fig. 5). Se observó en todos los ratones tratados con saxatilina-r a una dosis de 5 o 10 mg/kg (Fig. 5). El tiempo hasta la recanalización eficaz fue el siguiente: (a)  $32,92 \pm 23,52$  min en ratones tratados con saxatilina-r a 2,5 mg/kg; (b)  $21,75 \pm 21,62$  min en ratones tratados con saxatilina-r a 3,75 mg/kg; (c)  $13,92 \pm 6,02$  min en ratones tratados con saxatilina-r a 5 mg/kg; y (d)  $19,46 \pm 19,75$  minutos en ratones tratados con saxatilina-r a 10 mg/kg. Asimismo, la recanalización eficaz se evaluó según el método de administración de saxatilina-r. Todos los ratones tratados con 5 mg/kg de saxatilina-r lograron una recanalización eficaz, excepto dos ratones a los que se les administró una inyección en bolo de la dosis total. El tiempo hasta la recanalización eficaz fue el siguiente: (a)  $2,86 \pm 0,22$  min en ratones tratados con una inyección en bolo de la dosis total; (b)  $13,44 \pm 26,31$  min en ratones tratados con una inyección doble en bolo; (c)  $19,48 \pm 25,94$  min en ratones tratados con una inyección en bolo con la mitad de la dosis y después de la infusión continua de la otra mitad de la dosis; y (d)  $13,92 \pm 6,02$  con una inyección en bolo de 10 % de la dosis total e infusión continua de la dosis restante. El tiempo hasta la recanalización eficaz fue más corto en el grupo con inyección en bolo de dosis total que en el grupo con inyección en bolo de 10 % de la dosis total e infusión continua de la dosis restante ( $p = 0,004$ ).

25 Mortalidad y hemorragia después del tratamiento con saxatilina-r

Se usaron un total de 51 animales para la evaluación de los efectos trombolíticos de la saxatilina-r. Entre ellos, un animal murió por hemorragia en el sitio de la incisión cervical aproximadamente 90 minutos después de la inyección en bolo en el grupo de inyección en bolo de 5 mg/kg de saxatilina-r. Adicionalmente, en el mismo grupo, un animal sufrió hemorragia en la incisión cervical con inyección en bolo de 5 mg/kg de saxatilina-r.

Medición de la actividad de derivados de saxatilina

35 *Ensayo de agregación plaquetaria in vitro*

Los derivados de la saxatilina y ADP se administraron a PRP (plasma rico en plaquetas) de ratón y se midió el nivel de agregación usando un agregómetro (CHRONO-LOG, EE. UU.) para evaluar la actividad de los presentes derivados de saxatilina (Tabla 1).

40 Tabla 1. Actividad *in vitro* de los derivados de saxatilina y saxatilina-r

inhibidor	CI <sub>50</sub> (nM)
saxatilina	176
SX1	349
SX2	991
SX3	918
XL1	1,007
XL2	986
XL3	1,064
LS1	1,117
LS2	1,009
LS3	1,003

45 Como se muestra en la Tabla 1 y la Fig. 6, las actividades de SX1 (349) y SX3 (918) como derivados de saxatilina del presente invento fueron la actividad más alta y se pudo verificar que el patrón inhibidor de agregación plaquetaria es similar a saxatilina.

Tomados en conjunto, aunque hay algunas diferencias entre todas las saxatilinas y los derivados de saxatilina, cuando se compararon los niveles de inhibición de agregación según el intervalo de concentración del tratamiento, se pudo determinar que el presente tratamiento con derivados de saxatilina (por ejemplo, SX1, 1 µM; SX3, 4 µM) es similar al efecto de la saxatilina (aproximadamente 0,7 µM) (Fig. 6).

Efectos trombolíticos de los derivados de saxatilina

55 Los efectos trombolíticos de saxatilina y los derivados de saxatilina (SX1, SX3) se evaluaron usando los datos del área bajo la curva flujo-tiempo como los mismos experimentos (Figs. 7 y 8). Las dosis de administración de

saxatilina y derivados de saxatilina se trataron por igual. Cuando se administraron 20 mg/kg de dosis, se restableció el grupo administrado con saxatilina 60,92 ± 39,52 % del flujo sanguíneo, se restableció el grupo administrado con SX1 78,56 ± 16,24 % del flujo sanguíneo y se restauró el grupo administrado con SX3 69,15 ± 14,89 % del flujo sanguíneo. Cuando se administraron 40 mg/kg de dosis, tanto el grupo administrado con saxatilina como el grupo administrado con derivados de saxatilina (SX1, SX3) restablecieron el flujo sanguíneo normal y se mantuvieron sin reoclusión. Aunque no hubo reoclusión, los grupos administrados con derivados de saxatilina (SX1, SX3) se analizaron para mostrar que la fluctuación del flujo sanguíneo era inferior a la saxatilina de tipo salvaje, lo que demuestra que el flujo sanguíneo se mantuvo estable (Fig. 7).

A una dosis de 20 mg/kg, no existen diferencias significativas en los niveles restaurados del flujo sanguíneo. Sin embargo, la frecuencia de reoclusión post-recanalización y la fluctuación del flujo sanguíneo se redujeron significativamente en el tratamiento trombolítico por derivados de saxatilina (SX1) en comparación con la saxatilina de tipo salvaje, abordando que el flujo sanguíneo normal se mantuvo de forma estable (Fig. 8).

## Referencias

(1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group." *N Engl J Med* 333(24): 1581-1587.

Abou-Chebl, A., C. T. Bajzer, et al. (2005). "Multimodal therapy for the treatment of severe ischemic stroke combining GPIIb/IIIa antagonists and angioplasty after failure of thrombolysis." *Stroke* 36(10): 2286-2288.

Abumiya, T., R. Fitridge, et al. (2000). "Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia." *Stroke* 31(6): 1402-1409; discussion 1409-1410.

Adams, H., R. Adams, et al. (2005). "Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: 2005 guidelines update a scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association." *Stroke* 36(4): 916-923.

Adams, H. P., Jr., M. B. Efron, et al. (2008). "Emergency administration of abciximab for treatment of patients with acute ischemic stroke: results of an international phase III trial: Abciximab in Emergency Treatment of Stroke Trial (AbESTT-II)." *Stroke* 39(1): 87-99.

Alexandrov, A. V. y J. C. Grotta (2002). "Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator." *Neurology* 59(6): 862-867.

Caplan, L. R., J. P. Mohr, et al. (1997). "Should thrombolytic therapy be the first-line treatment for acute ischemic stroke? Thrombolysis--not a panacea for ischemic stroke." *N Engl J Med* 337(18): 1309-1310; discussion 1313.

Chen, H., W. Mo, et al. (2007). "Characterization of a novel bifunctional mutant of staphylokinase with platelet-targeted thrombolysis and antiplatelet aggregation activities." *BMC Mol Biol* 8: 88.

Chen, Z. L. y S. Strickland (1997). "Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin." *Cell* 91(7): 917-925.

Choi, J. H., B. T. Bateman, et al. (2006). "Endovascular recanalization therapy in acute ischemic stroke." *Stroke* 37(2): 419-424.

Choudhri, T. F., B. L. Hoh, et al. (1998). "Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation." *J Clin Invest* 102(7): 1301-1310.

Ciccone, A., I. Abraha, et al. (2007). "Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors for Acute Ischemic Stroke." *Stroke*.

Eckert, B., C. Koch, et al. (2005). "Aggressive therapy with intravenous abciximab and intra-arterial rTPA and additional PTA/stenting improves clinical outcome in acute vertebralbasilar occlusion: combined local fibrinolysis and intravenous abciximab in acute vertebralbasilar stroke treatment (FAST): results of a multicenter study." *Stroke* 36(6): 1160-1165.

Hallenbeck, J. M. y A. J. Dutka (1990). "Background review and current concepts of reperfusion injury." *Arch Neurol* 47(11): 1245-1254.

Heo, J. H., K. Y. Lee, et al. (2003). "Immediate reocclusion following a successful thrombolysis in acute stroke: a pilot study." *Neurology* 60(10): 1684-1687.

Hong, S. Y., Y. S. Koh, et al. (2002). "Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration." *Thromb Res* 105(1): 79-86.

Hong, S. Y., Y. D. Sohn, et al. (2002). "Structural and functional significance of disulfide bonds in saxatilin, a 7.7 kDa disintegrin." *Biochem Biophys Res Commun* 293(1): 530-536.

Hussain, M. S., R. Lin, et al. (2010). "Symptomatic delayed reocclusion after initial successful revascularization in acute ischemic stroke." *J Stroke Cerebrovasc Dis* 19(1): 36-39.

Jang, Y. J., O. H. Jeon, et al. (2007). "Saxatilin, a snake venom disintegrin, regulates platelet activation associated with human vascular endothelial cell migration and invasion." *J Vasc Res* 44(2): 129-137.

Konstantinides, S., K. Schafer, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice." *Circulation* 103(4): 576-583.

Kurz, K. D., B. W. Main, et al. (1990). "Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride." *Thromb Res* 60(4): 269-280.

Lopez-Yunez, A. M., A. Bruno, et al. (2001). "Protocol violations in community-based rTPA stroke treatment are associated with symptomatic intracerebral hemorrhage." *Stroke* 32(1): 12-16.

Matys, T. y S. Strickland (2003). "Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage." *Nat Med* 9(4): 371-372; author reply 372-373.

Nicole, O., F. Docagne, *et al.* (2001). "The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling." *Nat Med* 7(1): 59-64.

Phillips, D. R., I. F. Charo, *et al.* (1988). "The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex." *Blood* 71(4): 831-843.

5 Qureshi, A. I., A. M. Siddiqui, *et al.* (2004). "Reocclusion of recanalized arteries during intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke." *AJNR Am J Neuroradiol* 25(2): 322-328.

Rha, J. H. y J. L. Saver (2007). "The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis." *Stroke* 38(3): 967-973.

10 Seitz, R. J., M. Hamzavi, *et al.* (2003). "Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in stroke: preliminary observations." *Stroke* 34(8): 1932-1935.

Seitz, R. J., S. Meisel, *et al.* (2004). "The effect of combined thrombolysis with rtPA and tirofiban on ischemic brain lesions." *Neurology* 62(11): 2110-2112.

Shattil, S. J. y M. H. Ginsberg (1997). "Integrin signaling in vascular biology." *J Clin Invest* 100(11 Supl.): S91-95.

Sohn, Y. D., S. Y. Hong, *et al.* (2008). "Acute and repeated dose toxicity studies of recombinant saxatilin, a disintegrin from the Korean snake (*Gloydius saxatilis*)." *Toxicol* 51(3): 406-417.

15 Wang, Y. F., S. E. Tsirka, *et al.* (1998). "Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice." *Nat Med* 4(2): 228-231.

Wardlaw, J. M., V. Murray, *et al.* (2009). "Thrombolysis for acute ischaemic stroke." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD000213.

20 Yepes, M., M. Sandkvist, *et al.* (2002). "Regulation of seizure spreading by neuroserpin and tissue-type plasminogen activator is plasminogen-independent." *J Clin Invest* 109(12): 1571-1578.

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University

25 <120> Composición para trombólisis y composición farmacéutica para tratar enfermedades relacionadas con la oclusión o estrechez de los vasos sanguíneos que comprenden las mismas

<130> PP110022

30 <150> KR 10-2010-0107760

<151> 01-11-2010

<160> 21

35 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligopéptido

45 <400> 1

Gly Arg Gly Asp Ser Pro  
1 5

<210> 2

50 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Oligopéptido

<400> 2

Gly Ser Ser Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala  
1 5 10

60

ES 2 679 400 T3

5  
 <210> 3  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligopéptido

10  
 <400> 3

```

  Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly
   1          5          10
  Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg
           20          25
  Met Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala
           35          40          45
  Gly Cys Pro Arg Asn Pro Phe His Ala
                                50          55
  
```

15  
 <210> 4  
 <211> 56  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligopéptido

20  
 <400> 4

```

  Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly Leu
   1          5          10
  Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg Met
           20          25
  Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala Gly
           35          40          45
  Cys Pro Arg Asn Pro Phe His Ala
           50          55
  
```

25  
 <210> 5  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Oligopéptido

<400> 5

ES 2 679 400 T3

Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg Met Ala  
 20 25 30  
 Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala Gly Cys  
 35 40 45  
 Pro Arg Asn Pro Phe His Ala  
 50 55

5 <210> 6  
 <211> 53  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligopéptido  
 <400> 6

Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly Leu Cys Cys Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg Met Ala Arg Gly  
 20 25 30  
 Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala Gly Cys Pro Arg  
 35 40 45  
 Asn Pro Phe His Ala  
 50

15 <210> 7  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligopéptido  
 <400> 7

25 Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly Leu Cys Cys Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg Met Ala Arg Gly  
 20 25 30  
 Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala Gly Cys  
 35 40 45

30 <210> 8  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 679 400 T3

<220>  
<223> Oligopéptido

5 <400> 8

Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg  
 20 25 30  
 Met Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala  
 35 40 45  
 Gly Cys Pro Arg Asn Pro  
 50

<210> 9  
<211> 53  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Oligopéptido

15 <400> 9

Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg Met  
 20 25 30  
 Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala Gly  
 35 40 45  
 Cys Pro Arg Asn Pro  
 50

<210> 10  
<211> 52  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Oligopéptido

25 <400> 10

Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg Met Ala  
 20 25 30  
 Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala Gly Cys  
 35 40 45  
 Pro Arg Asn Pro  
 50

30

ES 2 679 400 T3

<210> 11  
 <211> 50  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Oligopéptido

<400> 11

10

```

Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly Leu Cys Cys Asp
 1           5           10           15
Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg Met Ala Arg Gly
          20           25           30
Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala Gly Cys Pro Arg
          35           40           45
Asn Pro
          50
    
```

<210> 12  
 <211> 73  
 <212> PRT  
 <213> Agkistrodon saxatilis emelianov

15

<400> 12

```

Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ala Pro Ala Asn Pro Cys Cys
 1           5           10           15
Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly
          20           25           30
Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Met Lys Glu Gly Thr Ile Cys Arg
          35           40           45
Met Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Ile Ser Ala
          50           55           60
Gly Cys Pro Arg Asn Pro Phe His Ala
 65           70
    
```

20

<210> 13  
 <211> 177  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> SX-1

<400> 13

30

```

gatgctgcaa cctgtaaact gagaccaggg ggcgagtgtg cagaaggact gtgttgtgac      60
cagtgcagat ttatgaaaga aggaacaata tgccggatgg caaggggtga tgacatggat      120
gattactgca atggcatatc tgctggctgt cccagaaatc ccttccatgc ctaataa      177
    
```

ES 2 679 400 T3

5	<210> 14 <211> 174 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> SX-2		
10	<400> 14		
	<b>gctgcaacct gtaaaactgag accagggggcg cagtgtgcag aaggactgtg ttgtgaccag</b>		<b>60</b>
	<b>tgcaagattta tgaagaagga aacaatatgc cggatggcaa ggggtgatga catggatgat</b>		<b>120</b>
	<b>tactgcaatg gcataatctgc tggctgtccc agaaatccct tccatgccta ataa</b>		<b>174</b>
15	<210> 15 <211> 171 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> SX-3		
20	<400> 15		
	<b>gcaacctgta aactgagacc agggggcgcag tgtgcagaag gactgtgttg tgaccagtgc</b>		<b>60</b>
	<b>agatttatga aagaaggaac aatatgccgg atggcaagggt gtgatgacat ggatgattac</b>		<b>120</b>
	<b>tgcaatggca tatctgtctg ctgtcccaga aatcccttcc atgcctaata a</b>		<b>171</b>
25	<210> 16 <211> 165 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> XL-1		
	<400> 16		
	<b>tgtaaaactga gaccaggggc gcagtgtgca gaaggactgt gttgtgacca gtgcagattt</b>		<b>60</b>
	<b>atgaaagaag gaacaatatg ccggatggca aggggtgatg acatggatga ttactgcaat</b>		<b>120</b>
35	<b>ggcatatctg ctggctgtcc cagaaatccc ttccatgcoct aataa</b>		<b>165</b>
40	<210> 17 <211> 144 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> XL-2		
45	<400> 17		

ES 2 679 400 T3

	<b>tgtaaactga gaccaggggc gcagtgtgca gaaggactgt gttgtgacca gtgcagattt</b>	<b>60</b>
	<b>atgaaagaag gaacaatatg ccggatggca aggggtgatg acatggatga ttactgcaat</b>	<b>120</b>
	<b>ggcatatctg ctggctgtta ataa</b>	<b>144</b>
5	<210> 18 <211> 156 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> XL-3 <400> 18	
	<b>tgtaaactga gaccaggggc gcagtgtgca gaaggactgt gttgtgacca gtgcagattt</b>	<b>60</b>
	<b>atgaaagaag gaacaatatg ccggatggca aggggtgatg acatggatga ttactgcaat</b>	<b>120</b>
	<b>ggcatatctg ctggctgtcc cagaaatccc taataa</b>	<b>156</b>
15	<210> 19 <211> 168 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> LS-1  <400> 19	
	<b>gatgctgcaa cctgtaaact gagaccaggg ggcagtgtg cagaaggact gtgttgtgac</b>	<b>60</b>
	<b>cagtgcagat ttatgaaaga aggaacaata tgccggatgg caaggggtga tgacatggat</b>	<b>120</b>
	<b>gattactgca atggcatatc tgctggctgt cccagaaatc cctaataa</b>	<b>168</b>
25	<210> 20 <211> 165 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> LS-2	
35	<400> 20	
	<b>gctgcaacct gtaaactgag accaggggcg cagtgtgacag aaggactgtg ttgtgaccag</b>	<b>60</b>
	<b>tgcaagattta tgaaagaagg aacaatatgc ccgatggcaa ggggtgatga catggatgat</b>	<b>120</b>
	<b>tactgcaatg gcataatctgc tggctgtccc agaaatccct aataa</b>	<b>165</b>
40	<210> 21 <211> 162 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> LS-3	

ES 2 679 400 T3

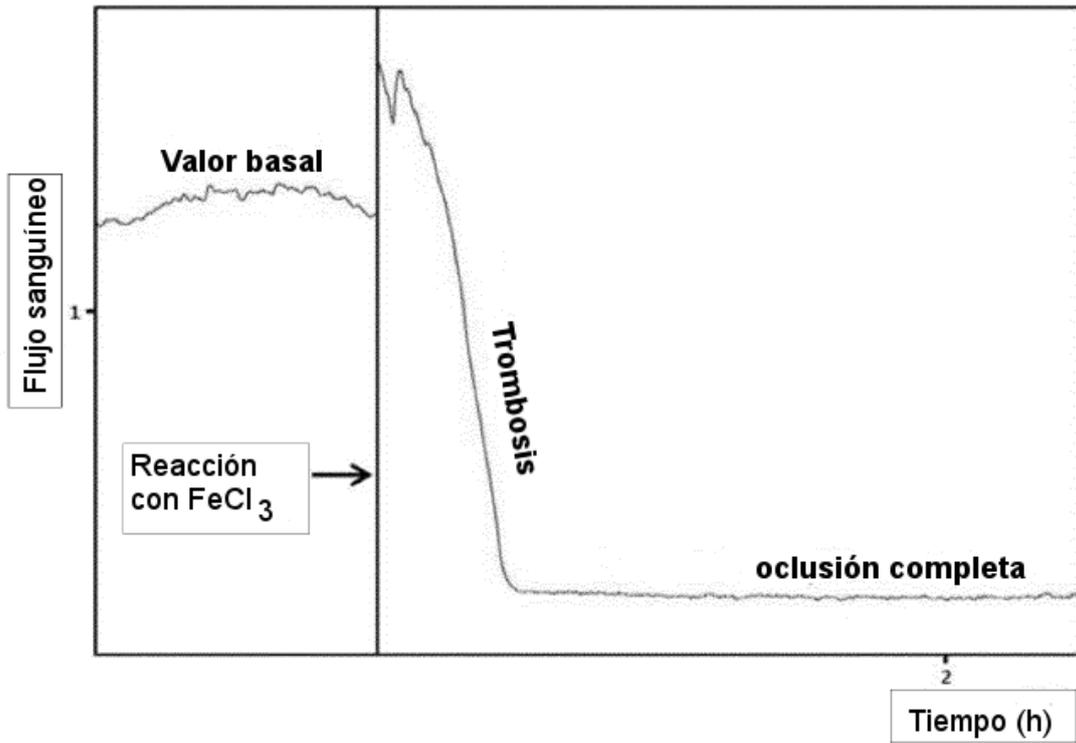
<400> 21

<b>gcaacctgta aactgagacc aggggcccag tgtgcagaag gactgtgttg tgaccagtgc</b>	<b>60</b>
<b>agatttatga aagaaggaac aatatgccgg atggcaaggg gtgatgacat ggatgattac</b>	<b>120</b>
<b>tgcaatggca tatctgctgg ctgtcccaga aatccctaataa</b>	<b>162</b>

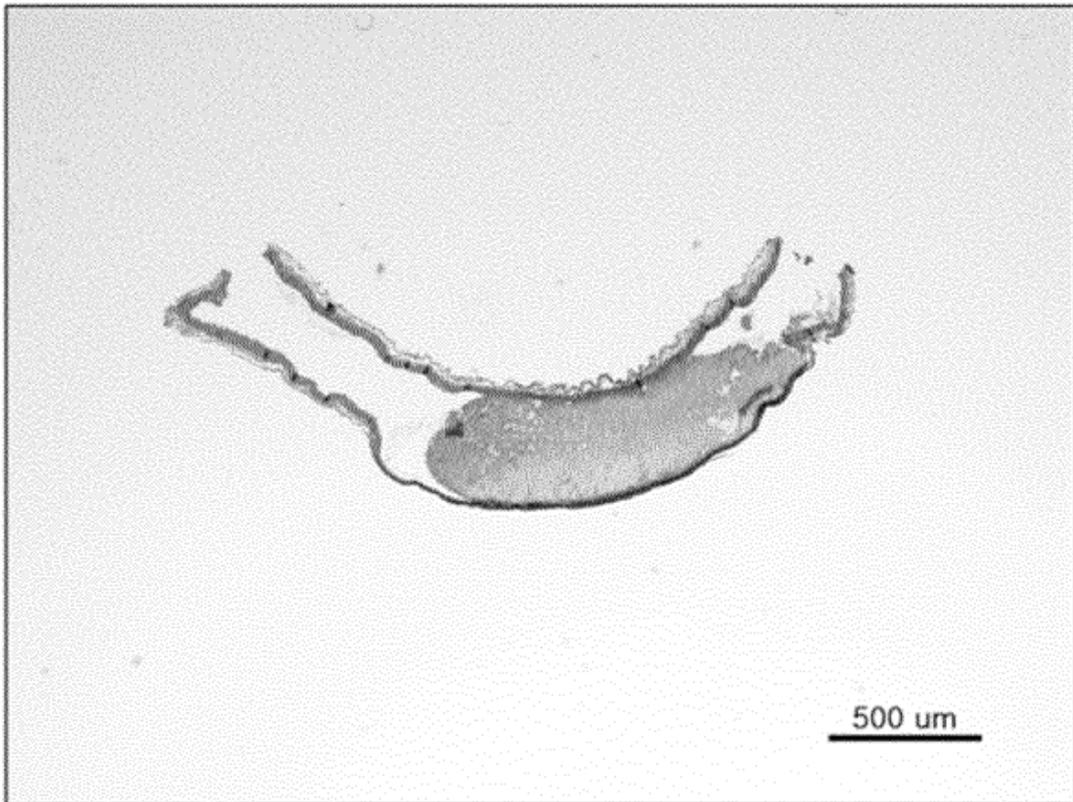
**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para su uso en trombósis *in vivo*, que comprende:
  - 5 (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3-12; y
  - (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
3. Un péptido que tiene actividad trombolítica, que consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3 y 5.

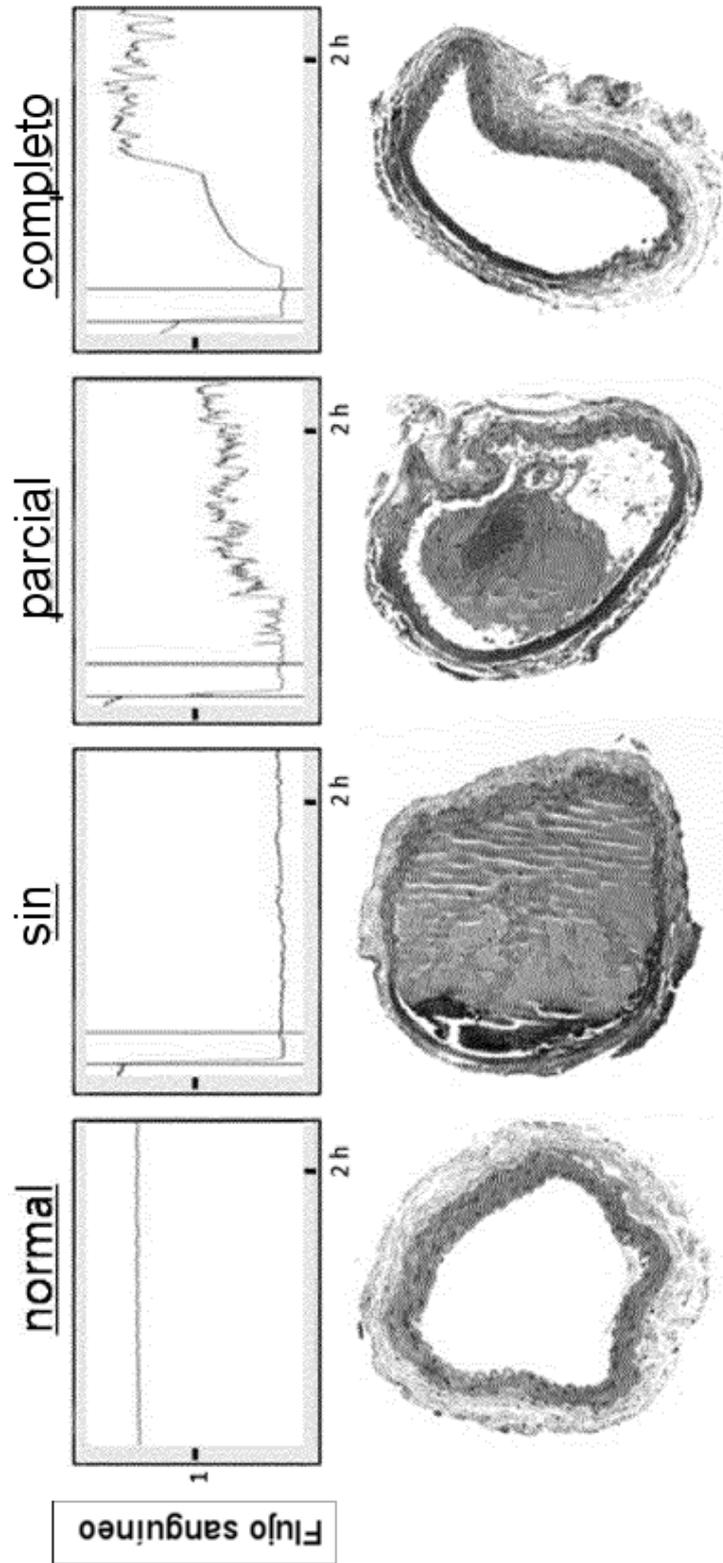
**Fig. 1a**



**Fig. 1b**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

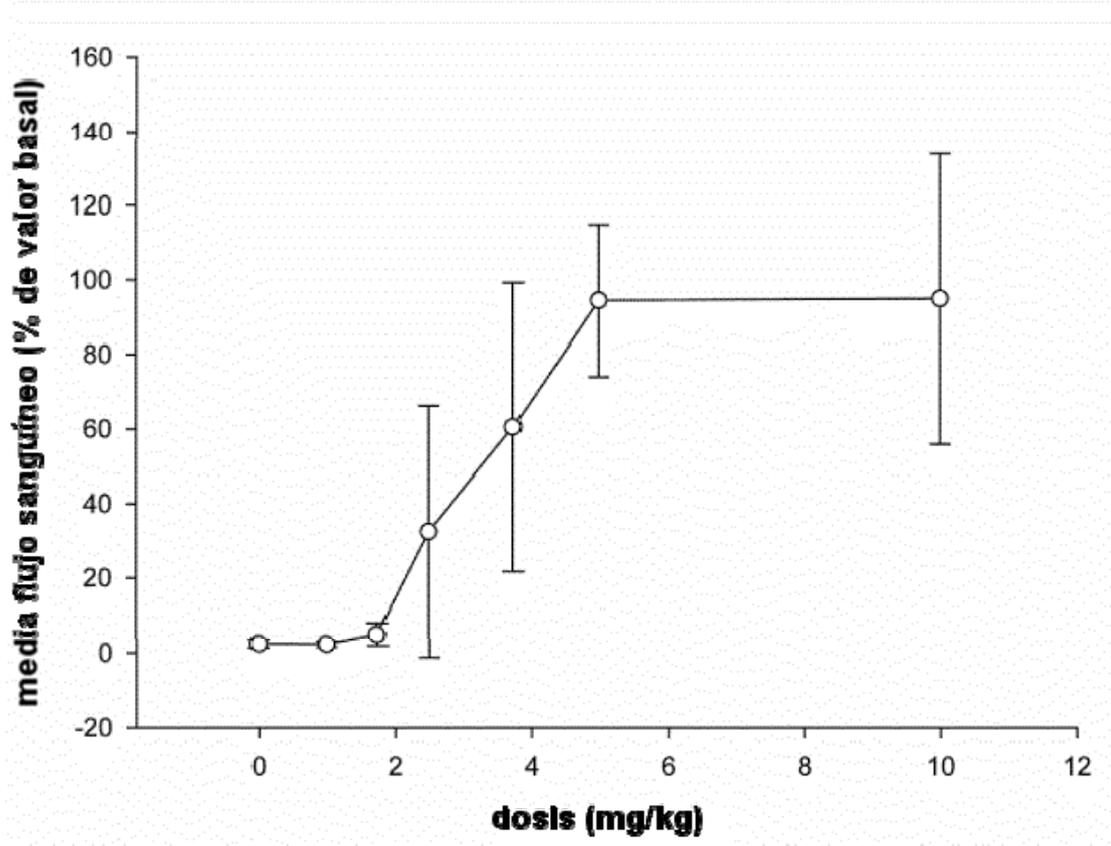
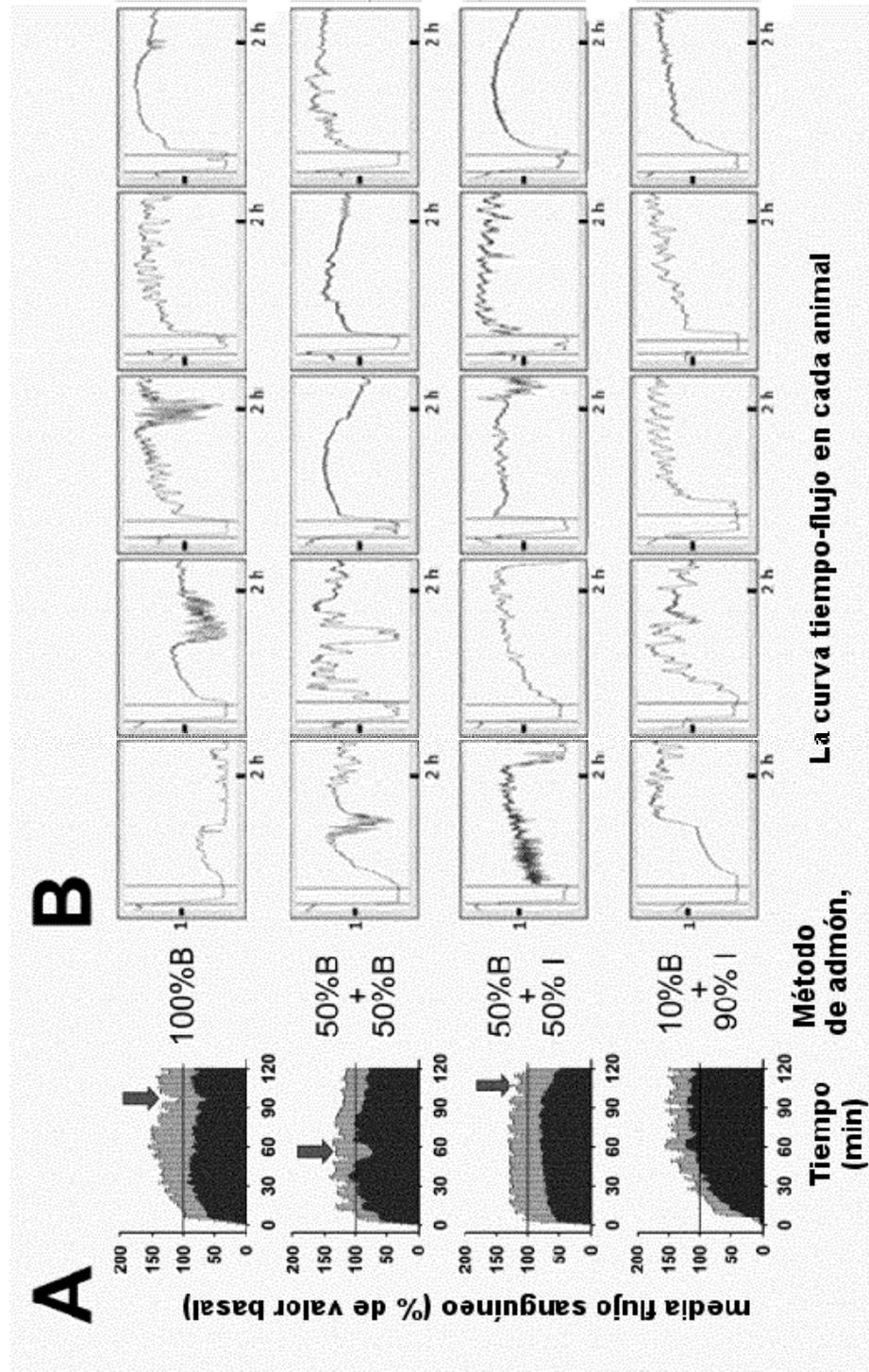
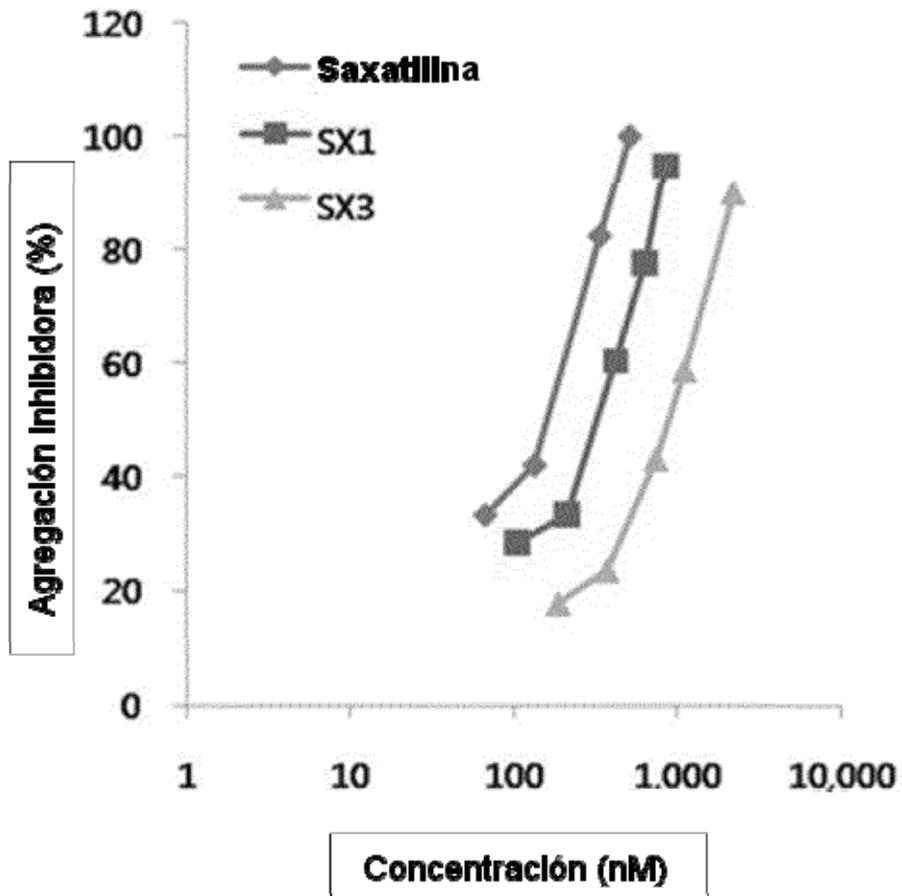


Fig. 4

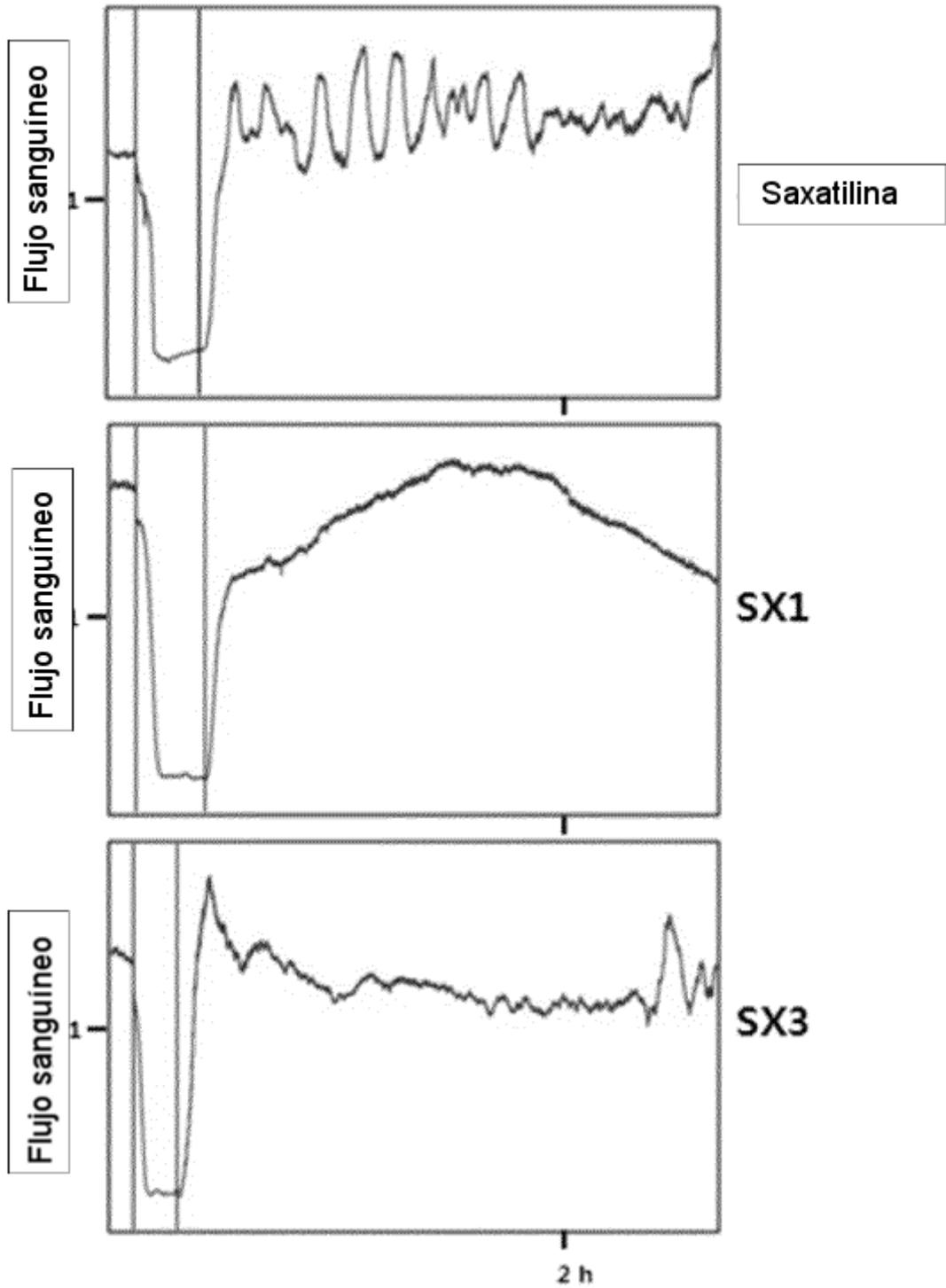




**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

